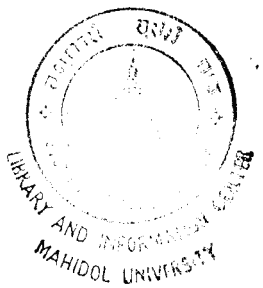
25 JUN 2003



STUDY ON MICROBIAL THERMOSTABLE β-MANNANASE

SUTTIDARAK CHAIJAN

Thesis Advisors
Dr.
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-2826-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S967st
2003
c.2

Copyright by Mahidol University

STUDY ON MICROBIAL THERMOSTABLE β-MANNANASE

SUTTIDARAK CHAIJAN 4237008 SCMI/M

M.Sc.(MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISOR : SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D., VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D., WATANALAI PANBANGRED, D.Eng.

ABSTRACT

This research aimed to find a thermostable β-mannanase suitable for use as an enzyme additive in feed for monogastric animals in order to improve feed utilization and digestion. The ideal enzyme for this purpose should be able to withstand the high temperature used during the process of feed making, though it should function optimally in the animal gut at the body temperature. In this study, β-mannanase producing microorganisms were isolated from soil using a selective medium which contained galactomannan from locust bean gum as the sole carbon and energy source. A producer of the most thermostable β-mannanase obtained from this screening program was identified as *Bacillus subtilis* and was designated strain 'MAN-1'. Optimum culture condition for *B. subtilis* MAN-1 to induce β-mannanase production was investigated. β-mannanase in the culture supernate was isolated and purified by ultrafiltration, anion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose CL-6B), hydrophobic interaction chromatography (Phenylagarose CL-4B), and high-resolution gel filtration chromatography (Superdex 200 HR 10/30). The enzyme was purified by 94 folds with a net activity yield of 2.9 %. This mannanase existed as a single-chain protein as its molecular weights estimated by native PAGE and SDS-PAGE were 41,000 and 39,500, respectively. The pI value was found to be 5.4. The enzyme was most active at pH 7.0 and 60 °C and could retain more than 80% of its activity after heating at 60 °C for 30 min. The sequencing of the first 20 N-terminal amino acids of this enzyme was identical to that of the β-mannanase from *B. subtillis* 168. After PCR and DNA sequencing, an ORF of 1,089 nucleotides was found for the β-mannanase gene of *B. subtillis* MAN-1, they encoded a protein of 362 amino acids in which the first 26 residues were identified as the signal peptide. The calculated molecular weight and pI value of the deduced mature enzyme (336 amino acid) were 38,100 and 5.54, respectivety. The G+C content of the gene was 42.79 %. No promoter could be found for this ORF. This suggested that the gene should be transcribed as part of a polycistronic mRNA together with other related genes co-regulated in an operon.

KEY WORDS : β-MANNANASE / *BACILLUS SUBTILIS* / GALACTOMANNAN / PURIFICATION / DNA-SEQUENCING

105 P. ISBN 974-04-2826-6

Copyright by Mahidol University

การศึกษาเอ็นไซม์เบต้า-แมนนาเนสทนร้อนจากจุลินทรีย์ (STUDY ON MICROBIAL THERMOSTABLE β-MANNANASE)

สุทธิดารักษ์ ชัยจันทร์ 4237008 SCMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุเทพ ไวยครุฑธา, Ph.D., วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาเอ็นไซม์เบต้า-แมนนาเนส ทนร้อน ที่เหมาะแก่การผสมลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์กระเพาะเดี่ยว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการการย่อยและการใช้ประโยชน์จากอาหาร เอ็นไซม์ที่ต้องการในงานวิจัยนี้คือสามารถทนอุณหภูมิสูงในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้แล้วเอ็นไซม์ควรจะทำงานได้ดีในสภาวะอุณหภูมิในร่างกายสัตว์ด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากดินโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกาแลคโตแมนแนนจาก locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์เบต้า-แมนนาเนส ทนร้อนที่สุด ที่ได้จากวิธีการคัดเลือกนี้คือ *Bacillus subtilis* โดยให้ชื่อว่า สายพันธุ์ MAN-1 และได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอ็นไซม์เบต้า-แมนนาเนส โดยสกัดและทำเอ็นไซม์ที่อยู่ในน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิด้วยวิธี ultrafiltration, anion exchange chromatography (DEAE-Sepharose CL-6B), hydrophobic interaction chromatography (Phenylagarose CL-4B), และ high-resolution gel filtration chromatography (Superdex 200HR 10/30) เอ็นไซม์ที่ได้ บริสุทธิ์ขึ้น 94 เท่า และมีกิจกรรมสุทธิ 2.9 เปอร์เซ็นต์ เอ็นไซม์แมนนาเนสนี้ประกอบด้วยสายโปรตีนเพียงเส้นเดียว ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจาก native-PAGE และ SDS-PAGE ได้ค่า 41,000 และ 39,500 ตามลำดับ และค่า pI เท่ากับ 5.4 กิจกรรมของเอ็นไซม์นี้สูงสุดที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์หลังจากให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ลำดับกรดอะมิโน 20 ตัวแรกจากปลาย N เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์แมนนาเนสจาก *B. subtilis* 168 หลังจาก PCR และหาลำดับ DNA ของยีนเบต้า-แมนนาเนส จาก *B. subtilis* MAN-1 พบว่ามี ORF 1,089 นิวคลีโอไทด์และแปลรหัสสร้างโปรตีนที่มีจำนวนกรดอะมิโน 362 ตัว โดยที่กรดอะมิโน 26 ตัวแรกคือ signal peptide น้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่คำนวณจากเอ็นไซม์ที่ mature (กรดอะมิโน 336 ตัว) ได้ค่า 38,100 และ 5.54 ตามลำดับ ยีนนี้มีค่า G+C content เท่ากับ 42.79 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบว่ามี promoter บน ORF นี้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีนนี้จะถูกอ่านรหัสเป็นแบบ polycistronic mRNA ร่วมกับยีนอื่นภายใต้การควบคุมของ operon เดียวกัน

105 หน้า. ISBN 974-04-2826-6

Copyright by Mahidol University